

球形芽孢杆菌 TS-1 丙酮粉对七种蚊虫的毒力测定

任改新* 孙桂华** 许荣满*** 张京生*** 陆宝麟***

摘要 用乳糖-丙酮沉淀法制备的球形芽孢杆菌 *Bacillus sphaericus*, TS-1 菌粉对七种蚊虫幼虫进行了毒力测定,以淡色库蚊,致倦库蚊最为敏感,其 LC_{50} 分别为 $8.1 \mu\text{g/L}$ ($1.79 \times 10^2 \text{ cfu/ml}$), $8.9 \mu\text{g/L}$ ($1.96 \times 10^2 \text{ cfu/ml}$),三带喙库蚊敏感性较淡色库蚊差 13 倍,2 龄白纹伊蚊和中华按蚊分别差 20 和 600 倍;黄斑伊蚊,二林埃及伊蚊剂量高达 10^3-10^6 cfu/ml 相差 1,000—10,000 倍以上几乎无效。本文结合 *B. t. i.* 标准生物测定方法,对毒力测定中检查时间、数据、虫龄、虫数、饲料等问题进行了讨论。

关键词 球形芽孢杆菌 TS-1 丙酮粉 库蚊 按蚊 伊蚊 毒力测定方法及标准。

球形芽孢杆菌 *Bacillus sphaericus* (下称 *B. S.*) 广泛分布于水域土壤中,为兼性昆虫病原菌;该种群仅有属于血清型 $H_{5a, 5b, 25}$ 的有些株对蚊幼虫具有高的致病力。对大多数库蚊类幼虫毒效高,对按蚊、伊蚊则因品系而异。该菌不仅对大多数库蚊有高效,且在污水及某些蚊幼孳生地,残效期可长达 9 个月,与苏云金杆菌 *Bacillus thuringiensis* H 14 相比有其独特之处 (Singer, 1980; Davidson, 1982)。1981 年以来我们首次从我国分布的球形芽孢杆菌中分离筛选出 10 余株对蚊幼具有高效的球形芽孢杆菌,对其代表株 TS-1 生物学特性、毒效、生产、毒物本质等进行了系统的研究,结果表明该菌有一定的应用价值 (任改新等, 1982; 1984; 1985; Ren Gai-xin 等, 1984)。本文报道该菌 TS-1 丙酮粉按照标准化生物测试程序对七种蚊幼虫的毒效结果,并分析讨论了毒力测定中统计时间、虫龄、虫数、饲料等对测定结果的影响,为高效菌株的筛选及产品标准化毒力测定提供了依据。

材料及方法

菌种 从南开大学蚊虫孳生地水土样品中分离,经形态、生理生化、血清学鉴定为球形芽孢杆菌血清型 $H_{5a, 5b}$ 编号为 TS-1,其有别于标准株 1593 的特性是仅有一条大质粒带,且在 7% NaCl 中能生长 (任改新等, 1982)。

菌剂的制备 由于 *B. S.* 的杀虫毒力直接与其芽孢形成有关,其毒素主要定位在细胞壁及芽孢壁上 (Myers 等, 1979; 1980),故挑选芽孢形成百分率高,比较同步的单株接种于 NY 肉汤培养基上活化,然后用 NY 固体配方扩大培养 (任改新等, 1984),在 30°C

本文于 1984 年 10 月收到。

* 南开大学生物系

** 天津市卫生防病中心

*** 中国人民解放军军事医学科学院五所六室

经 15 天左右,使其芽孢形成达 80% 左右收集菌苔,经洗涤离心 ($12,000-15,000r/m15' \times 3$),称其湿重后参考 Dulmage 等(1970)乳糖-丙酮法,取得均匀易溶解的菌粉制剂(下称菌粉)。以平板计数测其每毫克含菌数为 $220.5 \times 10^8/\text{克}$ (包括菌体 V_e 、芽孢 S ,全部菌落形成单位 CFU) 及活芽孢数 $179.3 \times 10^8/\text{克}$ (65°C 30 分钟热处理)。保存在 4°C 备用。

虫种来源 全部测试用虫均为恒温恒湿养虫室饲养的 2—3 龄幼虫。虫种有淡色库蚊 *Culex pipiens pallens* Coquillett、致倦库蚊 *C. quinquefasciatus* Say、三带喙库蚊 *C. tritaeniorhynchus* Giles、中华按蚊 *Anopheles sinensis* Wiedemann、白纹伊蚊 *Aedes albopictus* Skuse、埃及伊蚊二株 *Ae. aegypti* Linneus、黄斑伊蚊 *Ae. flavopictus* Yamada。

生物测定 参考世界卫生组织 (WHO) 对苏云金杆菌血清型 $H_{14}(B. t. i.)$ IPS-78 测定标准方法 (de Barjac, 1979) 进行测定。称取 TS-1 菌粉 50mg 置于 20—50ml 血清瓶内(内含 15 个玻璃珠, 10ml 蒸馏水),在 700 次/分混匀器上处理 10 分钟,取其 1ml 于含有 99ml 蒸馏水的锥形瓶中,于混匀器上处理 5 分钟得 50mg/L 原液。

根据预备试验所预测的浓度范围,配制总量为 200ml 的 5—6 个稀释液(使其最高浓度死亡率在 80—95%,最低浓度死亡率在 5—20%)。

每个测定用 500ml 容量的白色搪瓷盆定量加入 150ml 蒸馏水,再加入不同量的原液混匀使其成测试所需浓度。同时选适龄健康幼虫 50 头于小烧杯内,加蒸馏水至 50ml,然后分别全部倒入已稀释好的不同浓度菌液的盆内使其总量为 200ml,每次每个浓度 100 头试虫(对照组 100 头)分两个瓷盆,为了比较或分 4 盆。测试全过程在 26°C 进行,为减少误差,每个测定结果要在不同日期重复 2—3 次,并计算标准误。

数据分析 实验观察记录 24、48 小时死亡百分率,死亡的标准是幼虫对刺激失灵,对照死亡超过 10% 的实验结果作废,超过 5% 以 Abbott 公式计算校正。所求得不同浓度的死亡百分率,利用 Sharp EL-5002 计算机计算 LC_{50} 、标准误、95% 可信限及回归式。

结 果 与 讨 论

1. TS-1 的毒力因昆虫种株不同而异,它们的敏感程度顺序是:淡色库蚊 > 致倦库蚊 > 三带喙库蚊 > 白纹伊蚊 > 中华按蚊 > 黄斑伊蚊 > 埃及伊蚊。其中对淡色、致倦和三带喙三种库蚊毒力最高,其 3 龄幼虫 48 小时 LC_{50} 依次为 $8.1\mu\text{g/L}$ ($1.79 \times 10^2\text{cfu/ml}^*$), $8.9\mu\text{g/L}$ ($1.96 \times 10^2\text{cfu/ml}$), $108\mu\text{g/L}$ ($2.381 \times 10^3\text{cfu/ml}$)。二株埃及伊蚊均不敏感,剂量高达 10^5-10^6cfu/ml ,相差大约,1,000—10,000 倍以上,几乎无效。这与 Singer (1980) 的论述相一致。但本文使用:①纯净的病原菌制剂;②实验室饲养供试虫种;③标准的统一试验条件对七种蚊幼虫的测定结果尚属首次报道(见表 1)。

从表 1 可以看出球形芽孢杆菌毒力测定不同于 *B. t. i.* 及一般化学药物,它的死亡高峰在 24—48 小时之间,如中华按蚊二龄幼虫对 TS-1 粉 24 小时和 48 小时 LC_{50} 分别为 17.41 和 5.046mg/L ,相差三倍,因此以 48 小时结果为标准有利于比较。此外测定实验以三龄初幼虫较为合适(约 5mm 长,对照死亡极少),不宜用四龄幼虫,以避免在 48 小

* 菌落形成单位 (cfu) 包括菌体及芽孢

表 1 TS-1 菌粉对七种蚊幼虫的毒力比较

蚊种	龄期	作用时间 (小时)	LC ₅₀ mg/L 及可信限	LC ₅₀ (cfu/ml)	回归式
淡色库蚊	3	24	0.0169(0.014—0.02)	3.73×10^2	$y = 2.5815 + 1.97x$
淡色库蚊	3	48	0.008125(0.0049—0.0134)	1.79×10^2	$y = 3.6518 + 0.7059x$
致倦库蚊	3	24	0.243(0.0213—0.028)	5.34×10^3	$y = 1.3537 + 2.631x$
致倦库蚊	3	48	0.0089(0.007—0.011)	1.96×10^2	$y = 3.375 + 1.715x$
三带喙库蚊	3	24	0.42(0.3661—0.4835)	9.261×10^3	$y = 3.291 + 2.739x$
三带喙库蚊	3	48	0.108(0.0921—0.1264)	2.381×10^3	$y = 2.736 + 2.191x$
白纹伊蚊	3	24	6.402(5.6038—6.5151)	1.4116×10^3	$y = 2.2078 + 3.5807x$
白纹伊蚊	3	48	1.7396(1.468—2.06)	3.836×10^4	$y = 4.599 + 1.664x$
白纹伊蚊	2	48	0.2345(0.18—0.30)	5.17×10^3	$y = 2.837 + 1.579x$
中华按蚊	2	24	17.41(15.2019—19.8655)	3.839×10^3	$y = 1.6159 + 2.727x$
中华按蚊	2	48	5.0469(4.4955—5.6653)	1.113×10^3	$y = 3.6421 + 1.9351x$
黄斑伊蚊	3	48	15mg/L 34%	3.308×10^3	
埃及伊蚊(Bala 株)	3	48	115mg/L 无效	2.536×10^6	
埃及伊蚊(海南株)	3	48	20mg/L 20%	4.41×10^3	

时内有化蛹个体而影响实验结果的统计。

菌剂对白纹伊蚊二、三龄幼虫测定结果表明：三龄幼虫很不敏感，但二龄幼虫则较敏感(见图 1)。

从图 1 可见白纹伊蚊二龄幼虫 48 小时 LC₅₀ 为 0.2345mg/L，而三龄则为 1.7396mg/L，毒效相差几乎 8 倍。因此生物测定要获得稳定可靠的数据，既要严格挑选测试虫种，又要选定同龄期生理状况一致的幼虫，在统一的基础上进行比较。由于淡色库蚊饲养容易且最敏感，故 *B. S.* 的生物测定建议用淡色库蚊三龄初幼虫作为标准虫。

2. 生物测定过程中每个试验瓷盆中的虫种虫数均需定量标准化，每次测定总数不能少于 100 头。否则结果即有一定的差异(见图 2)。

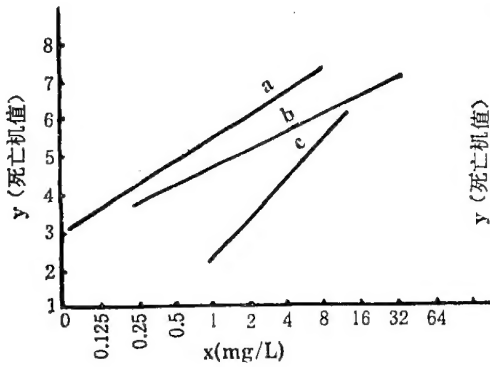


图 1 TS-1 对不同龄期白纹伊蚊的毒力影响
a. 二龄 48 小时 b. 三龄 48 小时
c. 三龄 24 小时

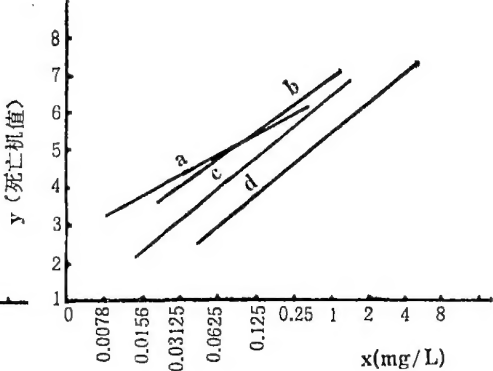


图 2 供试淡色库蚊虫数对 TS-1 毒力测定的影响
a. (25×4)48 小时 b. (50×2)48 小时
c. (25×4)24 小时 d. (50×2)24 小时

3. 关于生物测定过程中添加饲料问题，细菌杀虫剂不同于化学药物作用快，球形芽孢杆菌的死亡高峰在 24—48 小时，长时间不给蚊幼虫加饲料，幼虫明显衰弱，对照死亡多影响结果的准确性，故建议 24 小时观察后加少许饲料，以提高数据的可靠性。

4. 关于产品标准化, 利用乳糖-丙酮沉淀法提取 TS-1 菌剂易为水溶解成均匀的悬液, 重复性好, 制备简单, 不需冷冻干燥设备, 可大量制备, 再用国际标准标定效价(毒力单位)后提供国内生产使用单位作为国内标准, 以比较每批产品的效价。此外上述方法也可用于不同菌株的发酵液的毒力测定, 以比较筛选高毒力的菌株或菌剂, 结果比较稳定。

在完成上述实验后, 我们收到了巴斯德研究所提供的参考标准品——球形芽孢杆菌品系 1593-4 冷冻干燥品 RB-80 效价为 1,000 国际毒力单位。用 RB-80 作 TS-1 粉剂效价测定, 根据公式:

$$\text{供测菌剂国际毒力单位 IU/mg} = \frac{\text{标准菌剂的 LC}_{50}}{\text{供测菌剂的 LC}_{50}} \times 1000 \text{IU/mg}$$

标定了 TS-1 粉的毒力单位为 542.25 ITU, 可作为国内参考标准。参考标准品与未知菌剂同时、同条件进行生物测定, 不但消除每次测定虫情, 操作处理所造成的误差, 而且在产品鉴定中用标准品的单位来标定供测品的毒力单位, 以达到产品制剂的效价统一而标准化。

参 考 文 献

- 任改新, 陈婉等 1982 球形芽孢杆菌对淡色尖音库蚊的毒性及新分离株。昆虫学报 25(3): 349—50。
- 任改新, 孙桂华等 1984 球形芽孢杆菌杀灭淡色库蚊的室内外试验。微生物学通报 11(4): 166。
- 任改新, 钱广华等 1985 天津球形芽孢杆菌一号的发酵试验。微生物学通报 12(4): 145。
- de Barjac, H. 1979 Note sur la preparation d'une formulation de reference. IPS 78. pour le tirage biologique des formulation experimentales et industrielles du serotype H-14 de *Bacillus thuringiensis*. Mimeographed document WHO/VBC/79.741, 6 pages.
- Davidson, E. W. 1982 Insecticidal factors from *Bacillus sphaericus* and production of biocides from this organism. in Frank Michal ed., "Basic Biology of Microbial Larvicides of Vectors of Human Diseases", pp 53—63, Geneva, Switzerland.
- Dulmage, H. T. Gorrea, J. A. and Martinez, A. J. 1970 Co-precipitation with lactose as a means of recovering the sporecrystal complex of *Bacillus thuringiensis*. J. Invertebr. Pathol. 15: 15—20.
- Myers, P. S. Yousten, A. A. and Davidson, E. W. 1979 Comparative studies of the mosquito larval toxin of *Bacillus Sphaericus* SSII-1 and 1593. Can. J. Microbiol., 25: 1227—31.
- Myers, P. S. and Yousten A. A. 1980 Localization of mosquito larval toxin of *Bacillus sphaericus* 1593. Appl. and Enviro. Microbiol., 39: 1205—11.
- Ren Gai-Xin, Chen Wan et al. 1984 Biochemical and serological characterization of *Bacillus sphaericus* strains and their toxicity to mosquito larvae. in Perry L. Adkisson & Shijun Ma ed., "The Proceedings of The Chinese Academy of Sciences-United States National Academy of Sciences Joint Symposium on Biological Control of Insects", September 25—28, 1982 pp. 419—426, Science Press.
- Singer, S. 1980 *Bacillus sphaericus* for the control of mosquitoes. Biotech., Bioeng., 22: 1335—55.

TOXICITY ASSAY OF ACETONE POWDER FROM *BACILLUS SPHAERICUS* STRAIN TS-1 ON SEVEN SPECIES OF MOSQUITO LARVAE

REN GAI-XIN

(Department of Biology, Nankai University)

SUN GUI-HUA

(Tianjin Hygienic and Anti-epidemic Station)

XU RONG-MAN ZHANG JING-SHENG LU BAO-LIN

(Institute of Microbiology and Epidemiology, Academy of Military Medical Sciences)

The larvicidal potency to mosquito larvae of acetone powder precipitated from *Bacillus sphaericus* strain Ts-1 which was isolated from a water pool in Nankai University campus in Tianjin has been studied. The results from laboratory tests showed that the *Culex* larvae including *C. pipiens pallens*, *C. quinquefasciatus* and *C. tritaeniorhynchus* were highly susceptible, with LC_{50} of 8.1 $\mu\text{g/l}$ (1.79×10^3 cfu/ml), 8.9 $\mu\text{g/l}$ (1.96×10^3 cfu/ml) and 108.0 $\mu\text{g/l}$ (2.38×10^3 cfu/ml) after 46 hour treatment respectively, while *Anopheles sinensis* was less susceptible, with LC_{50} of 5.069 mg/l. The second to third instar larvae of *Aedes albopictus* was also susceptible with LC_{50} of 0.2—1.7 mg/l, while *Ae. aegypti* and *Ae. flavopictus* were not, with LC_{50} up to 15—115 mg/l (10^{5-6} cfu/ml). The technique of toxicity assay is discussed.

Key words *Bacillus sphaericus* strain TS-1 — *Culex* — *Anopheles* — *Aedes* — toxicity assay and standard